

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
20 décembre 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/96876 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

G01N 33/574

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/01815

(22) Date de dépôt international : 12 juin 2001 (12.06.2001)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

00/07476

13 juin 2000 (13.06.2000) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOMERIEUX S.A. [FR/FR]; Chemin de l'Orme,
F-69280 Marcy l'Etoile (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : CHARRIER,
Jean-Philippe [FR/FR]; 8, rue des Bruyères, F-69130
Ecully (FR).

(74) Mandataire : BONNEAU, Gérard; Cabinet Bonneau,
Les Taissounières HB3, 1681, route des Dolines, F-06560
Sophia Antipolis (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: IMMUNOLOGICAL TEST AND DIAGNOSTIC KIT FOR PROSTATE ADENOCARCINOMA

(54) Titre : TEST IMMUNOLOGIQUE ET KIT DE DIAGNOSTIC D'UN ADENOCARCINOME DE LA PROSTATE

(57) Abstract: The invention concerns an analysis method for diagnosing a prostate adenocarcinoma or a benign prostatic hyper-
trophy in a male patient, not involving prostate biopsy, using the combination of at least a tissue marker (PSA) and at least an
inflammation marker (ACT) for the diagnosis. The invention also concerns a process using said method, an immunological test for
implementing such a method and a diagnostic kit. The invention is applicable to the diagnosis of prostatic adenocarcinoma or benign
prostatic hypertrophy.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une méthode d'analyse en vue du diagnostic d'un adénocarcinome de la prostate ou
d'une hypertrophie bénigne de la prostate chez un patient humain mâle, sans pratiquer de biopsie prostatique, qui utilise l'associa-
tion d'au moins un marqueur tissulaire (PSA) et d'au moins un marqueur de l'inflammation (ACT) pour le diagnostic. L'invention
concerne également un procédé utilisant une telle méthode, un test immunologique permettant de mettre en oeuvre un tel procédé et
un kit de diagnostic. L'invention est appliquée au diagnostic de l'adénocarcinome ou de l'hypertrophie bénigne de la prostate.

WO 01/96876 A1

Méthode, procédé, test immunologique et kit de diagnostic d'un adénocarcinome de la prostate ou d'une hypertrophie bénigne de la prostate

DESCRIPTION

5

La présente invention concerne une méthode de dépistage ou de diagnostic permettant de mettre en évidence la présence d'un cancer de la prostate dit adénocarcinome de la prostate, généralement abrégé sous la forme PCa, ou d'une hypertrophie bénigne de la prostate, dont l'abréviation est BPH, chez un patient, et ceci sans réaliser de biopsie. L'invention concerne plus généralement une méthode d'analyse en vue du diagnostic, du pronostic ou du suivi thérapeutique d'un cancer chez un patient humain.

Par diagnostic il faut comprendre que le marqueur permet de déterminer si le patient est atteint par une pathologie donnée (ou s'il n'est pas atteint). Par pronostic il faut comprendre que le marqueur permet de graduer la gravité de la pathologie. Le pronostic peut orienter les choix thérapeutiques. Enfin par suivi thérapeutique il faut comprendre que le marqueur permet de suivre l'efficacité du traitement. En cas d'échec du traitement (révélé par le marqueur), un traitement alternatif peut être proposé au patient.

20

Le PSA est produit par l'épithélium glandulaire de la prostate humaine, probablement sous une forme zymogène inactive (Lundwall *et al.* FEBS Lett 1987), et est sécrété dans le liquide séminal sous sa forme active (Lilja, J. Clin Invest 1985). L'activité biologique du PSA dans le liquide séminal est liée à sa fragmentation protéolytique limitée des protéines prédominantes sécrétées par les vésicules séminales (Lilja, J. Clin Invest 1985 ; Lilja *et al.* J. Clin Invest 1987 ; Mc Gee *et al.* Biol. reprod. 1988).

Le PSA est le principal marqueur du cancer de la prostate qui affectera, au cours de sa vie, un homme sur six en Occident. Cette protéase de la famille des kallikréines, principalement sécrétée par l'épithélium prostatique, est retrouvée à une concentration de 0,5 à 5 mg/ml dans le liquide séminal et à une concentration un million de fois

30

moindre dans le sérum d'un patient. Ainsi, le PSA est trouvé normalement à une concentration inférieure à 2,5 ng/ml dans le sérum. Cependant, cette concentration augmente en principe notablement lors d'un cancer de la prostate et modérément lors d'altérations bénignes telles que l'hypertrophie de la prostate bénigne (BPH) ou la prostatite aiguë.

La séquence protéique du PSA a été déterminée. Il s'agit d'une glycoprotéine comportant 237 acides aminés ("Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA". Lundwall A., Lilja H., 1987. *FEBS Lett* 214 : 317-322).

Cependant, la zone de recouvrement entre les différentes pathologies est responsable d'un manque important de sensibilité et de spécificité. C'est ainsi que 30 à 45 % des cancers confinés à la glande, qui constitue un stade précoce et potentiellement curable, ne sont pas dépistés avec le seuil usuel de 4 ng/ml alors que trois patients sur quatre sont suspectés à tort.

Par ailleurs, il a été montré récemment que dans le sérum, le PSA s'associait à des inhibiteurs de protéase, tels que l' α -1-antichymotrypsine (ACT), et que l'usage du ratio PSA libre sur PSA total permettait d'améliorer la spécificité du diagnostic.

L'ACT est une glycoprotéine plasmatique de 68.000 Da dont la séquence est connue (Chandra T., Stackhouse R., Kidd V. J., Robson K. J., Woo S. L. ; *Biochemistry* 1983 Oct. 25 ; 22 (22) : 5055-5061 ; Sequence homology between human α -1-antichymotrypsin, α -1-antitrypsin, and antithrombin III). Elle appartient à la famille des Serpines et inhibe de nombreuses protéases à Sérine, telle l' α -1-antichymotrypsine ou le PSA. Sa concentration sanguine augmente en cas de dommage cellulaire suite à une blessure, une intervention chirurgicale ou une infection. Elle fait partie des protéines caractéristiques de la réponse inflammatoire. L'intérêt de dosage de l'ACT a été décrit dans le cas de nombreuses pathologies, telles que l'arthrite rhumatoïde, la maladie d'Alzheimer, la maladie d'Hodgkin, les cancers gastriques... Mais l'intérêt du dosage de l'ACT sérique n'a pas été démontré à ce jour pour le diagnostic du cancer de la prostate. L'état de la technique pousse même l'homme du métier à ne pas s'y intéresser, puisque les ratios à base de concentration de PSA sont les seuls préconisés.

L'art antérieur montre donc qu'il existe des techniques permettant de diagnostiquer le développement d'un cancer de la prostate chez les patients. Ainsi, la demande de brevet WO-A-97/12245 revendique une méthode permettant de diagnostiquer un adénocarcinome de la prostate sans biopsie. Cette méthode consiste à mesurer, dans le sérum ou dans le sang des patients, la quantité totale de PSA. Si cette valeur est comprise entre 2,5 et 20 ng/ml, on mesure également la concentration de PSA libre, On calcule ensuite le ratio PSA libre sur PSA total. Si ce ratio est inférieur à 7 %, le diagnostic s'oriente vers un adénocarcinome de la prostate.

Toutefois, l'utilisation d'un seuil à 7 %, pour le diagnostic d'un cancer de la prostate, est controversée par de nombreux auteurs, comme le montre la publication de Lein et al, « Relation of free PSA/total PSA in serum for differentiating between patients with prostatic cancer and benign prostate hyperplasia : which cutoff should be used ? ». Dans ce document publié dans la revue Cancer Investigation, 16(1), 45-49, 1998, il a été démontré qu'il est difficile, par le biais de ce ratio, de différencier systématiquement un cancer ou adénocarcinome de la prostate, d'une hypertrophie bénigne de la prostate.

En outre la publication de Catalona et al., « Prostate Cancer Detection in Men With Serum PSA Concentrations of 2,6 to 4,0 ng/ml and Benign Prostate Examination », publiée dans JAMA du 14 Mai 1997-Vol 277, No,18, démontre qu'une concentration inférieure à 4 ng/ml doit être prise en considération pour dépister précocement un cancer de la prostate.

La demanderesse a décrit, dans une demande de brevet WO-A-00/02052, une méthode de diagnostic qui permet de combler le manque d'efficacité des tests dans la zone de concentration de PSA totale supérieur à 2 ng/ml. A cette fin, les formes moléculaires de PSA sérique de patients atteints de cancer ou de BPH ont été cartographiées par électrophorèse bi-dimensionnelle, associé à la détection par chimiluminescence, afin d'observer l'ensemble des formes de PSA libre, complexé et clivé.

Ainsi, les profils de sérum de cancéreux sont relativement homogènes, alors que ceux de BPH peuvent comporter une proportion relativement importante de formes clivées, et des spots légèrement plus basiques.

Il est donc démontré que l'augmentation du ratio PSA libre sur PSA total en cas de BPH peut être lié à l'existence de PSA clivé, enzymatiquement inactif et incapable de se lier à l'ACT, ou être en relation avec du PSA libre légèrement basique qui pourrait correspondre à la forme zymogène inactive.

5 Dans une autre demande de brevet FR00/04591, la demanderesse a mis au point des tests immunologiques pour mettre en oeuvre la méthode de diagnostic décrite dans WO-A-00/02052.

10 Pourtant, l'utilisation d'anticorps dirigés contre le PSA libre clivé ou non clivé est beaucoup plus difficile car il n'existe pas beaucoup d'anticorps commercialisés ou disponibles si l'on fait abstraction de ceux cités dans la demande de brevet FR00/04591. Ce n'est pas le cas d'autres paramètres, tels que PSA total (libre et complexé), PSA-ACT, PSA libre total (clivé et non clivé), qui sont des paramètres simples bien connus de l'état de la technique. Le ratio selon la présente invention est
15 établi par le dosage de paramètres bien connus dans l'art antérieur. Il peut donc être réalisé simplement dans la plupart des laboratoires d'analyses médicales.

 Ainsi, le PSA complexé avec l'ACT est dosé par exemple à l'aide d'anticorps décrits dans la demande de brevet WO-A-98/22509.

20 Le PSA total est dosé par exemple à l'aide d'anticorps décrits par H. Nagasaki et al. (1999), Clin. Chem. 45 : 4486-4496, ou par l'intermédiaire d'anticorps commercialisés par la société Scripps Laboratories (San Diego, USA).

 Le PSA libre est dosé par exemple à l'aide d'anticorps décrits dans la demande de brevet WO 92/01936, ou à l'aide d'anticorps monoclonaux commercialisés par la société Chagaï (Japon).

25 Enfin, l'ACT est dosé par exemple à l'aide d'anticorps décrits dans l'article de Sprecchia G., Petroboni V., Fratino P., Dander B., Introduction of antichymotrysin antibodies : their identification and interference with tryptic activity, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 1970 Feb. 15 ; 46(3) : 111-4. Des anticorps permettant de doser l'ACT sont par ailleurs commercialisés par exemple par la société Dako (Trappes, France) ou la société Valbiotech (Paris, France). Une méthode de dosage a été par exemple décrite
30 par Calvin J., Price C. P., Measurement of serum alpha-1-antichymotrypsin by immunoturbidimetry, Ann. Clin. Biochem. 1986 ; 23 ; 206-209.

L'invention consiste donc à doser dans un liquide biologique le PSA libre, le PSA total (ou le PSA-ACT) et l'ACT, puis à réaliser le ratio suivant :

$$\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA total}]^2}{[\text{PSA libre}]}, \text{ qui est exprimé en } (\mu\text{g/ml})^2.$$

5

Le patient est diagnostiqué comme ayant un adénocarcinome de la prostate, si le ratio est supérieur à une première valeur, ou comme ayant une hypertrophie bénigne de la prostate, si le ratio est inférieur à une deuxième valeur.

De plus, par rapport à l'usage du ratio PSA libre / PSA total bien connu dans l'art antérieur, le ratio selon la présente invention permet d'augmenter de façon très significative la discrimination entre hypertrophie bénigne de la prostate et adénocarcinome de la prostate. Par conséquent, l'invention permet de réduire considérablement le nombre de biopsies nécessaires à la confirmation des pathologies malignes. Elle contribue donc à réduire les coûts de santé publique et les désagréments occasionnés aux patients lors d'une biopsie.

15

Enfin ce ratio cumule en une seule valeur l'effet de trois paramètres : le ratio PSA libre / PSA total, le taux de PSA total et le taux d'ACT. De ce fait, le clinicien dispose d'une seule valeur à analyser ce qui facilite son interprétation. Il n'a plus besoin d'analyser de façon concomitante le ratio PSA libre / PSA total et le taux de PSA total comme cela est pratiqué dans l'art antérieur. De surcroît, la valeur du ratio de la présente invention augmente en cas de cancer alors qu'elle est faible en cas de hypertrophie bénigne de la prostate. Cette valeur permet ainsi de graduer aisément l'avancé et la gravité du cancer.

20

A cet effet, la présente invention concerne une méthode d'analyse en vue du diagnostic, du pronostic ou du suivi thérapeutique d'un adénocarcinome de la prostate ou d'une hypertrophie bénigne de la prostate chez un patient humain mâle, sans pratiquer de biopsie prostatique, qui utilise l'association d'au moins un marqueur tissulaire et d'au moins un marqueur de l'inflammation pour le diagnostic.

25

Cette méthode consiste à utiliser le PSA comme marqueur tissulaire et l'ACT comme marqueur de l'inflammation.

Selon un mode préférentiel de réalisation, le marqueur tissulaire est constitué par l'un et préférentiellement deux au moins des paramètres suivants impliqués dans un ratio :

- [PSA libre],
- [PSA total], et
- [PSA-ACT].

Selon un autre mode préférentiel de réalisation, le marqueur de l'inflammation est constitué par le paramètre suivant : [ACT].

Dans tous les cas de figure et selon une première méthode, le ratio qui utilise l'association d'au moins un marqueur tissulaire et d'au moins un marqueur de l'inflammation est le suivant :

$$\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA total}]^2}{[\text{PSA libre}]}$$

Selon cette première méthode, lorsque le ratio est supérieur 30 et préférentiellement à 50 ($\mu\text{g/ml}$)², on diagnostique un adénocarcinome de la prostate, et lorsque le ratio est inférieur à 16,5 et préférentiellement à 12 ($\mu\text{g/ml}$)², on diagnostique une hypertrophie bénigne de la prostate.

Dans tous les cas de figure et selon une deuxième méthode, le ratio qui utilise l'association d'au moins un marqueur tissulaire et d'au moins un marqueur de l'inflammation est le suivant :

$$\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA} - \text{ACT}] \times [\text{PSA total}]}{[\text{PSA libre}]}$$

Selon cette deuxième méthode, lorsque le ratio est supérieur à 23 préférentiellement à 45 ($\mu\text{g/ml}$)², on diagnostique un adénocarcinome de la prostate, et lorsque le ratio est inférieur à 13,5 et préférentiellement à 9 ($\mu\text{g/ml}$)², on diagnostique une hypertrophie bénigne de la prostate.

Dans tous les cas de figure et selon une troisième méthode, le ratio qui utilise l'association d'au moins un marqueur tissulaire et d'au moins un marqueur de l'inflammation est le suivant ou le ratio inverse :

$$\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA} - \text{ACT}]^2}{[\text{PSA libre}]}$$

Selon cette troisième méthode, lorsque le ratio est supérieur à 17 préférentiellement à 40 ($\mu\text{g/ml}$)², on diagnostique un adénocarcinome de la prostate, et lorsque le ratio est inférieur à 12 et préférentiellement à 7 ($\mu\text{g/ml}$)², on diagnostique une hypertrophie bénigne de la prostate.

De manière plus générale, l'invention a trait à une méthode d'analyse en vue du diagnostic, du pronostic ou du suivi thérapeutique d'un cancer chez un patient humain, qui utilise l'association d'au moins un marqueur tissulaire et d'au moins un marqueur de l'inflammation pour le diagnostic.

La présente invention concerne également un procédé utilisant une méthode, telle décrite ci-dessus, qui consiste à :

- déterminer la valeur des paramètres constituant le ratio qui doit être utilisé,
- déterminer la valeur du ratio,
- comparer le ratio trouvé par rapport aux valeurs de référence, et
- diagnostiquer soit un adénocarcinome de la prostate, soit une hypertrophie bénigne de la prostate, soit enfin une zone de flou impliquant de plus amples investigations, telles que biopsie, touché digital rectal, ultrasonographie trans-rectale.

L'invention concerne encore un test immunologique permettant de mettre en œuvre un procédé, tel que décrit précédemment, qui utilise :

- un et préférentiellement deux au moins des anticorps suivants : anti-PSA libre, anti-PSA total, et anti-PSA-ACT, en tant que marqueur tissulaire, et
- anti-ACT, en tant que marqueur de l'inflammation.

Enfin l'invention concerne un kit de diagnostic permettant de diagnostiquer, de pronostiquer ou de suivre thérapeutiquement un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint dudit adénocarcinome, ou permettant de différencier entre une pathologie bénigne de la prostate et un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint par l'une de ces maladies, ledit kit comprenant :

- des moyens pour doser un et préférentiellement deux au moins des paramètres suivants : PSA libre, PSA total, et PSA-ACT, en tant que marqueur tissulaire, et
- des moyens pour doser l'ACT, en tant que marqueur de l'inflammation.

Préférentiellement, les moyens pour doser sont des anticorps.

Les figures ci-jointes sont données à titre d'exemple explicatif et n'ont aucun caractère limitatif. Elles permettront de mieux comprendre l'invention.

5 La figure 1 représente un diagramme mettant en évidence les cas d'hypertrophie bénigne de la prostate et d'adénocarcinome de la prostate, en comparant la concentration de PSA total (en abscisse) par rapport au pourcentage correspondant au ratio des concentrations de PSA libre sur PSA total (en ordonnée).

10 La figure 2 représente un diagramme mettant en évidence les cas d'hypertrophie bénigne de la prostate et d'adénocarcinome de la prostate, en comparant la concentration de PSA total (en abscisse) par rapport à la concentration d'ACT (en ordonnée).

15 La figure 3 représente un diagramme mettant en évidence les cas d'hypertrophie bénigne de la prostate et d'adénocarcinome de la prostate, en comparant la concentration d'ACT (en abscisse) par rapport au pourcentage correspondant au ratio des concentrations de PSA libre sur PSA total (en ordonnée).

20 Enfin, la figure 4 représente un diagramme mettant en évidence les cas d'hypertrophie bénigne de la prostate et d'adénocarcinome de la prostate, en comparant la concentration de PSA total (en abscisse) par rapport à un ratio selon l'invention (en ordonnée).

25 L'intérêt du dosage du PSA total et du ratio PSA libre / total sont bien connu dans l'art antérieur, comme cela a été bien exposé précédemment. Par contre, l'intérêt du dosage de l'ACT n'a pas été démontré dans un but de diagnostic et de différenciation entre hypertrophie bénigne de la prostate et adénocarcinome de la prostate.

A - Expériences réalisées :

30 Le PSA libre a été dosé avec le kit FPSA Vidas (BioMérieux) selon les recommandations du fournisseur.

Le PSA total a été dosé avec le kit TPSA Vidas (BioMérieux) selon les recommandations du fournisseur.

L'ACT a été dosé par immunoturbidimétrie en adaptant une méthode décrite par J. Calvin et C. P. Price ("Mesure of serum α 1-antichymotrypsin by immunoturbidimetry" Ann, Clin, Biochem, 1986; 23: 206-209) selon le protocole
5 suivant :

- Préparer le tampon A : Phosphate de Sodium 5 mM, NaCl 130 mM, Polyethylene glycol 6000 à 64 g/l, pH=7,2.
- Préparer la solution B: dilution de l'anticorps anti-ACT (Dako, référence A0022) à
10 1/16 en tampon A.
- Préparer une gamme étalon d'ACT par dilution d'ACT purifié (Scipac référence P159-5) en tampon A.
- Diluer les sérums à analyser à 1/10 en tampon A.
- Incuber la gamme et les sérums 15 minutes à température ambiante.
- 15 • Centrifuger la gamme et les sérums 10 minutes à 2000 g et 15°C.
- Mesurer la complexation de l'anticorps anti-ACT et de l'ACT en suivant l'augmentation de Densité Optique (D.O.) à 340 nm et 700 nm sur l'automate Hitachi 704. L'appareil est programmé pour dilué 18 μ l d'échantillon dans 141 μ l de tampon A, réaliser un blanc sérum puis ajouter 141 μ l de solution B et lire la D.O. en point
20 final.
- Etablir une courbe étalon en reportant les concentrations de la gamme étalon en fonction des D.O. obtenues.
- Calculer les taux d'ACT des échantillons en reportant les D.O. obtenues pour les échantillons sur la courbe étalon.

25

Le ratio suivant est calculé :
$$\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA total}]^2}{[\text{PSA libre}]} \text{ (en } \mu\text{g/ml)}^2$$

Le diagnostic du cancer de la prostate est porté si le ratio précédent est supérieur inférieur à 30 ($\mu\text{g/ml}$)².

Le diagnostic de hypertrophie bénigne de la prostate est porté si le ratio précédent est inférieur à $16,5 (\mu\text{g/ml})^2$.

Le présent ratio de la présente invention a été appliqué à l'étude de vingt-huit cas (28) de BPH et de trente-huit cas (38) de cancers de la prostate. Les résultats sont indiqués sur le tableau 1 ci-dessous.

Patient	athologie	PSA total (ng/ml)	PSA libre (ng/ml)	ACT ($\mu\text{g/ml}$)	$\frac{[\text{PSA libre}]}{[\text{PSA total}]}$ (%)	$\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA total}]^2}{[\text{PSA libre}]}$
1	BPH	1,04	0,20	861,40	19,23	4,66
2	BPH	1,47	0,35	875,20	23,81	5,40
3	BPH	3,01	0,32	879,00	10,63	24,89
4	BPH	8,27	3,50	616,30	42,32	12,04
5	BPH	7,50	0,83	926,30	11,07	62,78
6	BPH	3,90	0,87	796,80	22,31	13,93
7	BPH	16	2,24	661,50	14,00	75,60
8	BPH	9,13	2,84	946,00	31,11	27,77
9	BPH	6,22	1,15	634,90	18,49	21,36
10	BPH	4,01	0,52	317,50	12,97	9,82
11	BPH	5,8	1,86	465,00	32,07	8,41
12	BPH	5,03	0,46	279,10	9,15	15,35
13	BPH	4,55	1,01	518,50	22,20	10,63
14	BPH	4,85	0,41	578,70	8,45	33,20
15	BPH	4,17	0,71	969,10	17,03	23,73
16	BPH	4,52	1,05	568,30	23,23	11,06
17	BPH	6,81	1,02	472,70	14,98	21,49
18	BPH	4,16	0,73	877,30	17,55	20,80
19	BPH	5,55	1,00	669,40	18,02	20,62
20	BPH	4,6	0,79	599,80	17,17	16,07

21	BPH	4,23	0,44	458,40	10,40	18,64
22	BPH	6,71	1,56	536,60	23,25	15,49
23	BPH	7,67	2,57	911,70	33,51	20,87
24	BPH	5,12	0,54	559,60	10,55	27,17
25	BPH	4,18	2,28	804,00	54,55	6,16
26	BPH	5,01	1,17	586,90	23,35	12,59
27	BPH	7,21	1,43	585,10	19,83	21,27
28	BPH	5,24	0,72	595,70	13,74	22,72
29	PCa	2,31	0,31	976,10	13,42	16,80
30	PCa	12,47	0,81	983,80	6,50	188,87
31	PCa	46,46	3,43	1165,30	7,38	733,33
32	PCa	98,82	7,68	852,70	7,77	1084,24
33	PCa	58,82	6,84	1096,00	11,63	554,38
34	PCa	17,49	1,09	757,00	6,23	212,45
35	PCa	31,01	2,58	1453,70	8,32	541,82
36	PCa	29,83	1,73	377,30	5,80	194,06
37	PCa	26,51	3,16	902,20	11,92	200,65
38	PCa	10,57	0,70	1059,80	6,62	169,15
39	PCa	10,55	2,09	2000,00	19,81	106,51
40	PCa	11,43	0,89	1496,50	7,79	219,67
41	PCa	40,39	10,00	668,10	24,76	108,99
42	PCa	7,9	1,79	1549,00	22,66	54,01
43	PCa	6,77	0,61	1311,70	9,01	98,56
44	PCa	5,56	0,86	835,20	15,47	30,02
45	PCa	10,84	2,56	662,70	23,62	30,42
46	PCa	713,00	104,00	1383,50	14,59	6762,77
47	PCa	11,00	1,21	703,00	11,00	70,30
48	PCa	10,5	0,84	801,30	8,00	105,17
49	PCa	9	2,61	1138,80	29,00	35,34

50	PCa	5,4	0,38	722,30	7,00	55,72
51	PCa	4000	567,00	1026,50	14,18	28966,49
52	PCa	9,5	0,34	734,40	3,58	194,94
53	PCa	9,58	1,23	853,30	12,84	63,67
54	PCa	7,07	1,24	606,20	17,54	24,44
55	PCa	4,09	0,70	907,90	17,11	21,70
56	PCa	6,81	0,92	762,50	13,51	38,44
57	PCa	18,41	1,64	1836,80	8,91	379,60
58	PCa	8,09	1,00	707,00	12,36	46,27
59	PCa	20,29	3,15	2000,00	15,52	261,39
60	PCa	29,98	7,15	727,00	23,85	91,39
61	PCa	7,39	1,18	508,30	15,97	23,52
62	PCa	5,42	0,84	790,90	15,50	27,66
63	PCa	5,66	0,70	967,70	12,37	44,29
64	PCa	5,42	0,30	546,90	5,54	53,55
65	PCa	4,98	0,29	596,30	5,82	50,99
66	PCa	4,63	0,71	776,00	15,33	23,43

Tableau 1 : Analyse de 28 cas de BPH et de 38 cas de PCa

Les résultats obtenus sur le tableau 1 sont représentés sur les figures 1 à 4.

5 La figure 1 illustre le pouvoir de discrimination du taux de PSA total et du ratio PSA libre / PSA total, tel qu'il est utilisé dans l'art antérieur. La représentation montre que ces deux dosages ne sont pas corrélés et conduisent à des informations complémentaires et indépendantes.

10 Ainsi, si l'on reprend la valeur de 7 % qui a été mise en exergue lors de l'analyse de l'état de la technique, il faut constater que si tous les cas, dont le ratio est inférieur à 7 %, sont des cas de cancer, il n'en va pas de même au dessus puisqu'entre 7 et 30 % les adénocarcinomes de la prostate et les hypertrophies bénignes de la prostate

sont parfaitement mélangés. Il n'y a qu'au dessus de 30 % que tous les cas sont des hypertrophies bénignes de la prostate.

Il y a donc une zone de flou qui est incompatible avec les problèmes de santé publique qui peuvent être générées. Il y a même une majorité de faux négatifs puisque
5 vingt-quatre (24) des trente-huit (38) cas de cancer sont dans cette zone.

La figure 2 illustre le pouvoir de discrimination de l'ACT associé au PSA total. La représentation montre que ces deux dosages ne sont pas corrélés et conduisent à des informations complémentaires et indépendantes.

10

La figure 3 illustre le pouvoir de discrimination de l'ACT associé au ratio PSA libre / PSA total. La représentation montre que ces deux dosages ne sont pas corrélés et conduisent à des informations complémentaires et indépendantes.

15 Il résulte donc des figures 1 à 3 que les dosages de l'ACT, du PSA total et du PSA libre / PSA total conduisent à des informations complémentaires mais indépendantes. Il est donc impossible de tirer des conclusions lorsque l'on regarde ces diagrammes (figures 2 et 3) ou bien leur interprétation est difficile et délicate (figure 1).

L'association de ces trois paramètres en une seule valeur selon le ratio décrit
20 dans la présente invention permet de manière surprenante d'associer la pertinence de chacun de ces paramètres pris séparément.

La figure 4 illustre le pouvoir de discrimination de l'invention caractérisé par l'usage du ratio en $(\mu\text{g/ml})^2$:
$$\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA total}]^2}{[\text{PSA libre}]}$$

25 Elle montre à titre d'exemple la corrélation entre ledit ratio et le taux de PSA total,

Les quatre tableaux 2 à 5 qui suivent illustrent l'intérêt de l'invention par rapport à l'usage du ratio PSA libre / total bien connu dans l'art antérieur.

$\frac{[\text{PSA libre}]}{[\text{PSA total}]}$	$\leq 7 \%$	7 à 25 %	$\geq 25 \%$
PCa	8 / 38 = 21,1%	29 / 38 = 76,3 %	1 / 38 = 2,6%
BPH	0 / 28 = 0 %	23 / 28 = 82,1 %	5 / 28 = 17,9%

Tableau 2 : Pouvoir discriminant du ratio $\frac{[\text{PSA libre}]}{[\text{PSA total}]}$ en utilisant les seuils définis dans la demande de brevet WO-A-97/12245

5

$\frac{[\text{PSA libre}]}{[\text{PSA total}]}$	$\leq 7 \%$	7 à 25 %	$\geq 25 \%$
PSA total	$\geq 10 \text{ ng/ml}$	$> 4 \text{ mais } < 10 \text{ ng/ml}$	$\leq 4 \text{ ng/ml}$
PCa	24 / 38 = 63,2 %	12 / 38 = 31,6 %	2 / 38 = 5,3 %
BPH	1 / 28 = 3,6 %	18 / 28 = 64,3 %	9 / 28 = 32,1 %

Tableau 3 : Pouvoir discriminant du ratio $\frac{[\text{PSA libre}]}{[\text{PSA total}]}$ avec les seuils précédents associés aux seuils de PSA total

10

$\frac{[\text{PSA libre}]}{[\text{PSA total}]}$	$\leq 10,4 \%$	10,4 à 29 %	$\geq 29 \%$
PCa	15 / 38 = 39,5 %	22 / 38 = 57,9 %	0 / 38 = 0 %
BPH	2 / 28 = 7,1 %	21 / 28 = 75 %	5 / 28 = 17,9%

Tableau 4 : Pouvoir discriminant du ratio $\frac{[\text{PSA libre}]}{[\text{PSA total}]}$ en utilisant des seuils optimisés de façon comparables à ceux du ratio $\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA total}]^2}{[\text{PSA libre}]}$

$\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA total}]^2}{[\text{PSA libre}]}$	$\geq 30 (\mu\text{g/ml})^2$	$16,5 \text{ à } 30 (\mu\text{g/ml})^2$	$\leq 16,5 (\mu\text{g/ml})^2$
PCa	32 / 38 = 84,2 %	6 / 38 = 15,8 %	0 / 38 = 0 %
BPH	3 / 28 = 10,7 %	12 / 28 = 42,9 %	13 / 28 = 46,4 %

5

Tableau 5 : Pouvoir discriminant du ratio $\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA total}]^2}{[\text{PSA libre}]}$ en utilisant des seuils optimisés

10 On remarque aisément que par rapport aux meilleurs critères utilisés dans l'art antérieur (tableau 4), le ratio proposé par la présente invention (tableau 5) permet d'augmenter très significativement le nombre de cas de cancer et de BPH correctement diagnostiqués (respectivement 32 contre 24 et 13 contre 9) et par la même occasion de réduire considérablement la zone d'incertitude (18 contre 30).

15 Le nombre de faux diagnostics est identique dans les deux cas, puisqu'il y a, pour notre invention, trois (3) cas qui sont classés comme hypertrophies bénignes de la prostate suite à une biopsie, alors que le ratio selon notre présente invention établissait des adénocarcinomes de la prostate. Dans le cas de ratios, selon l'état de la technique, deux (2) cas de cancers par biopsie sont en fait des hypertrophies bénignes de la prostate et une (1) hypertrophie bénigne de la prostate est en fait un adénocarcinome de la prostate pour l'art antérieur.

20

Même s'il y a le même nombre de faux positifs, notre ratio est plus favorable, car nous n'avons pas de cas de patient ayant un adénocarcinome de la prostate et qui n'est pas dépisté, alors qu'il y a deux cas selon l'état de la technique.

5 Il faut noter que contrairement à l'art antérieur (tableaux 2 et 3), la présente invention ne diagnostique aucun cas de cancer de façon erronée. Cette situation est beaucoup plus fâcheuse que le diagnostic erroné de hypertrophie bénigne de la prostate qui est possible, quoique rare, dans la présente invention (2 sur 66). En effet, un diagnostic de cancer de la prostate est classiquement confirmé par biopsie ce qui
10 minimise le risque de diagnostiquer à tort un cancer.

En revanche, aucune biopsie n'est pratiquée dans le cas d'un diagnostic de hypertrophie bénigne de la prostate. En conséquence, une personne atteinte d'un cancer et faussement diagnostiquée comme souffrant d'une hypertrophie bénigne de la prostate ne subira pas de thérapie adéquate. Son cancer risque alors d'être diagnostiqué
15 ultérieurement, à un stade plus avancé, ce qui réduit ses chances de guérison et son espérance de vie.

B - Expériences réalisables et éventuellement réalisées :

20 Toute autre méthode de dosage des trois paramètres (PSA libre, PSA total et ACT) est utilisable. A titre d'exemple, nous avons également mis en œuvre un dosage de l'ACT par immunoélectrophorèse et par ELISA.

Ce protocole de dosage de l'ACT par immunoélectrophorèse a été réalisé selon
25 la méthode de C. B. Laurell (Anal. Biochem, 1966, 15, 45-52) et adaptant une technique décrite par J. Calvin et C. P. Price ("Mesure of serum α 1-antichymotrypsin by immunoturbidimetry" Ann. Clin. Biochem, 1986 ; 23: 206-209). Ce protocole consiste en les étapes qui suivent :

- Préparer le tampon C : Veronal acide 1,842 g/l, Veronal sodée 10,3 g/l, acétate de
30 sodium 5,8 g/l, pH=8,6.
- Préparer la solution D : NaCl 9 g/l, bleu de Bromophénol 0,01 %.

- Préparer la solution E : Dissoudre 10 g/l d'Agarose dans le tampon C (dilué au 1/4) en chauffant la solution au bain marie puis la laisser refroidir à 55°C. Ajouter 147 µl d'anticorps anti-ACT (Dako, référence A0022) pour 22 ml de solution d'agarose.
- Préparer la solution F : Ethanol 25%, acide Acétique 10%, eau déminéralisée 65%.
- 5 • Préparer la solution G : Bleu de Coomassie R-250 dilué à 1,15 g/l en solution F.
- Couler 22 ml de solution E à 55°C sur une plaque de 10x13 cm de gel bond Agarose (Pharmacia, référence 80-1129-32). Laisser refroidir et gélifier.
- Réaliser des puits de 2 mm de diamètre sur le bord du gel de 13 cm.
- Installer le gel sur une cuve d'immunoélectrophorèse (Gelman Science, Deluxe
10 Electrophoresis Chamber) avec des mèches appliquées sur les bords du gel et trempant dans le tampon C.
- Préparer une gamme étalon d'ACT par dilution d'ACT purifié (Scipac référence P159-5) en tampon D.
- Diluer les sérums au 1/10 en tampon D.
- 15 • Déposer sur le gel 2 µl d'échantillon ou de point de gamme par puits.
- Laisser migrer environ 1 heure 10 minutes à 200 V et 400 mA.
- Sécher le gel par buvardage puis à l'étuve à 37°C.
- Colorer 1 minute avec la solution G.
- Décolorer avec la solution F jusqu'à obtenir un bruit de fond acceptable.
- 20 • Mesurer la hauteur des arcs de précipitation (rockets) visibles sur le gel.
- Etablir une courbe étalon en reportant les concentrations de la gamme étalon en fonction des hauteurs obtenues.
- Calculer les taux d'ACT des échantillons en reportant les hauteurs obtenues pour les échantillons sur la courbe étalon.

25

Il est également possible d'effectuer un protocole de dosage de l'ACT par ELISA sur microplaque. Dans ce cas le protocole consiste dans les étapes suivantes :

- Préparer le tampon H : Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane 0,2 M, Acide Maléique 0,2 M, pH=6,2.
- 30 • Préparer la solution I : tampon H plus 5% de caséine hydrolysée.

- Préparer le tampon J : tampon H plus 0,5% de tween 20.
- Préparer la solution K : Tris(hydroxyméthyl)-aminomethane 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, azide de sodium 0,9 g/l, pH=6,5.
- Diluer l'anticorps anti-ACT (Dako, référence A0022) à 1,86 µg/ml en tampon H.
- 5 • Répartir 100 µl de solution d'anticorps anti-ACT par puits de microplaque. Incuber 1 heure à 37°C. Aspirer la solution.
- Répartir 200 µl de solution I. Incuber 1 heure à 37°C. Aspirer la solution.
- Préparer une gamme étalon d'ACT par dilution d'ACT purifié (Scipac référence P159-5) en tampon H.
- 10 • Diluer les sérums à 1/500 en tampon H.
- Incuber 100 µl d'échantillon ou de point de gamme par puits 1 heure à 37°C.
- Laver par 3 x 300 µl de tampon J.
- Diluer le conjugué anti-ACT couplé à la phosphatase alcaline (bioMérieux) dans la solution K au 1/500.
- 15 • Incuber 100 µl de conjugué par puits 1 heure à 37°C.
- Laver par 3 x 300 µl de tampon J.
- Révéler avec 100 µl de substrat para-Nitro-Phenyl-Phosphate (pNPP).
- Stopper la révélation par 100 µl de soude 1M.
- Lire sur photospectromètre à 405 nm avec soustraction du bruit de fond à 630 nm.
- 20 • Etablir une courbe étalon en reportant les concentrations de la gamme étalon en fonction des D.O. obtenues.
- Calculer les taux d'ACT des échantillons en reportant les D.O. obtenues pour les échantillons sur la courbe étalon,

25 C - Modifications possibles de la méthode :

Il est également possible de mesurer le PSA-ACT en lieu et place du PSA total et d'utiliser le ratio suivant :

$$\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA - ACT}]^2}{[\text{PSA libre}]} \text{ en } (\mu\text{g/ml})^2.$$

Le patient est diagnostiqué comme ayant un adénocarcinome de la prostate, si le ratio est supérieur à une première valeur, ou comme ayant une hypertrophie bénigne de la prostate, si le ratio est inférieur à une deuxième valeur.

5

Il est également possible d'utiliser la concentration en PSA-ACT et en PSA total et d'utiliser le ratio suivant :

$$\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA} - \text{ACT}] \times [\text{PSA total}]}{[\text{PSA libre}]} \text{ en } (\mu\text{g/ml})^2.$$

10

L'inversion des ratios conduit bien évidemment aux mêmes diagnostics que les ratios représentés dans l'invention à condition d'adapter les seuils aux nouveaux calculs.

15

De façon intéressante, l'invention permet de diagnostiquer un cancer de la prostate sans utiliser de marqueur tumoraux stricto sensu. En effet, le PSA et l'ACT sont aussi bien exprimés chez un individu sain que chez un individu atteint d'un cancer de la prostate. En fait, le diagnostic repose ici sur l'association d'un marqueur tissulaire (le PSA) et d'un marqueur de l'inflammation (l'ACT). Or le seul marqueur à visée diagnostique utilisé actuellement en cancérologie est le PSA.

20

De nombreux marqueurs tumoraux ont été décrits, mais aucun ne permet un dépistage précoce de la maladie, leur utilisation est généralement limitée à un usage pronostique ou de suivi thérapeutique. L'invention démontre donc l'intérêt de l'association d'un marqueur tissulaire à un marqueur de l'inflammation pour le diagnostic d'un type de cancer. Une approche comparable est possible pour le dépistage d'autre type de cancer, ce qui serait extrêmement utile.

25

REVENDICATIONS

1. Méthode d'analyse en vue du diagnostic, du pronostic ou du suivi
5 thérapeutique d'un adénocarcinome de la prostate ou d'une hypertrophie bénigne de la prostate chez un patient humain mâle, sans pratiquer de biopsie prostatique, qui utilise l'association d'au moins un marqueur tissulaire et d'au moins un marqueur de l'inflammation pour le diagnostic.

10 2. Méthode, selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle consiste à utiliser le PSA comme marqueur tissulaire et l'ACT comme marqueur de l'inflammation.

15 3. Méthode, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le marqueur tissulaire est constitué par l'un et préférentiellement deux au moins des paramètres suivants impliqués dans un ratio :

- [PSA libre],
- [PSA total], et
- [PSA-ACT].

20

4. Méthode, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le marqueur de l'inflammation est constitué par le paramètre suivant : [ACT].

25 5. Méthode, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le ratio qui utilise l'association d'au moins un marqueur tissulaire et d'au moins un marqueur de l'inflammation est le suivant :

$$\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA total}]^2}{[\text{PSA libre}]}$$

30 6. Méthode, selon la revendication 5, caractérisée en ce que lorsque le ratio est supérieur 30 et préférentiellement à 50 ($\mu\text{g/ml}$)², on diagnostique un adénocarcinome de

la prostate, et lorsque le ratio est inférieur à 16,5 et préférentiellement à 12 ($\mu\text{g/ml}$)², on diagnostique une hypertrophie bénigne de la prostate.

- 5 7. Méthode, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le ratio qui utilise l'association d'au moins un marqueur tissulaire et d'au moins un marqueur de l'inflammation est le suivant :

$$\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA} - \text{ACT}] \times [\text{PSA total}]}{[\text{PSA libre}]}$$

- 10 8. Méthode, selon la revendication 7, caractérisée en ce que lorsque le ratio est supérieur 23 préférentiellement à 45 ($\mu\text{g/ml}$)², on diagnostique un adénocarcinome de la prostate, et lorsque le ratio est inférieur à 13,5 et préférentiellement à 9 ($\mu\text{g/ml}$)², on diagnostique une hypertrophie bénigne de la prostate.

- 15 9. Méthode, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le ratio qui utilise l'association d'au moins un marqueur tissulaire et d'au moins un marqueur de l'inflammation est le suivant ou le ratio inverse :

$$\frac{[\text{ACT}] \times [\text{PSA} - \text{ACT}]^2}{[\text{PSA libre}]}$$

- 20 10. Méthode, selon la revendication 9, caractérisée en ce que lorsque le ratio est supérieur 17 préférentiellement à 40 ($\mu\text{g/ml}$)², on diagnostique un adénocarcinome de la prostate, et lorsque le ratio est inférieur à 12 et préférentiellement à 7 ($\mu\text{g/ml}$)², on diagnostique une hypertrophie bénigne de la prostate.

- 25 11. Méthode d'analyse en vue du diagnostic, du pronostic ou du suivi thérapeutique d'un cancer chez un patient humain, qui utilise l'association d'au moins un marqueur tissulaire et d'au moins un marqueur de l'inflammation pour le diagnostic.

12. Procédé utilisant une méthode, selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il consiste à :

- déterminer la valeur des paramètres constituant le ratio qui doit être utilisé,
 - déterminer la valeur du ratio,
 - comparer le ratio trouvé par rapport aux valeurs de référence, et
 - diagnostiquer soit un adénocarcinome de la prostate, soit une hypertrophie bénigne de la prostate, soit enfin une zone de flou impliquant de plus amples investigations, telles
- 5 que biopsie, touché digital rectal, ultrasonographie trans-rectal.

13. Test immunologique permettant de mettre en œuvre un procédé, selon la revendication 12, qui utilise :

- 10
- un et préférentiellement deux au moins des anticorps suivants : anti-PSA libre, anti-PSA total, et anti-PSA-ACT, en tant que marqueur tissulaire, et
 - anti-ACT, en tant que marqueur de l'inflammation.

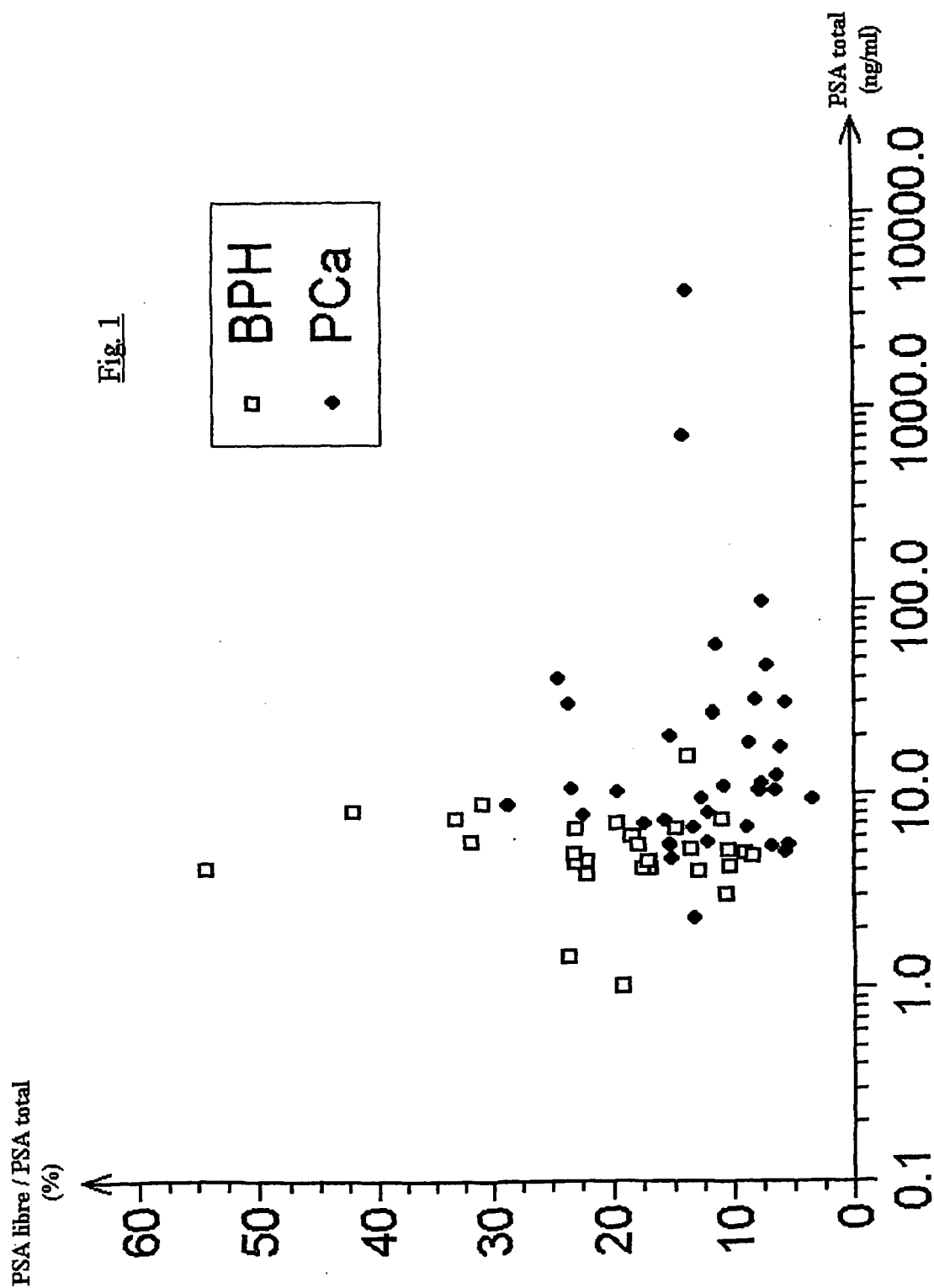
14. Kit de diagnostic permettant de diagnostiquer, pronostiquer ou suivre

15 thérapeutiquement un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint dudit adénocarcinome, ou permettant de différencier entre une pathologie bénigne de la prostate et un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint par l'une de ces maladies, ledit kit comprenant :

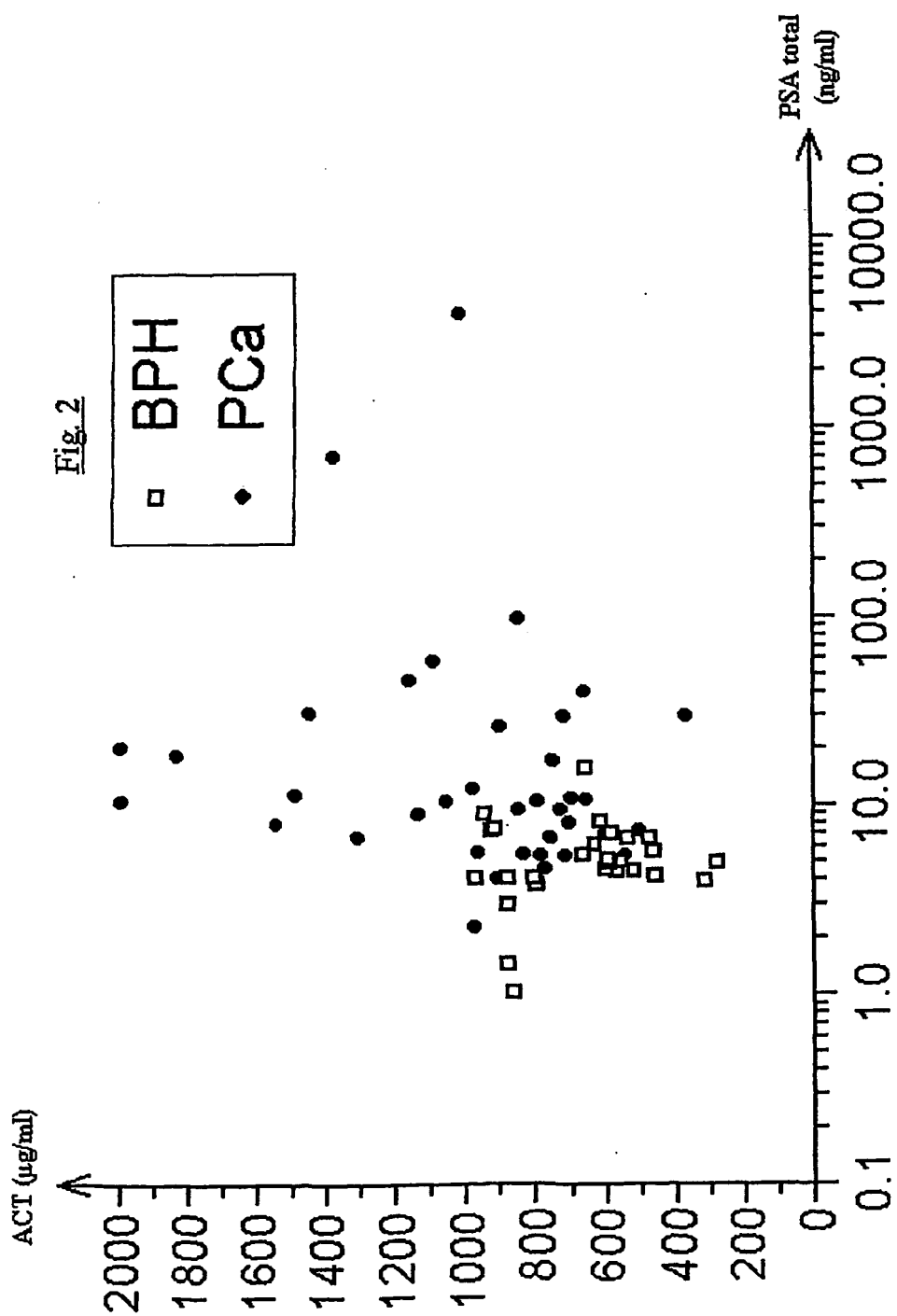
- 20
- des moyens pour doser un et préférentiellement deux au moins des paramètres suivants : PSA libre, PSA total, et PSA-ACT, en tant que marqueur tissulaire, et
 - des moyens pour doser l'ACT, en tant que marqueur de l'inflammation.

15. Kit selon la revendication 13, dans lequel lesdits moyens sont des anticorps.

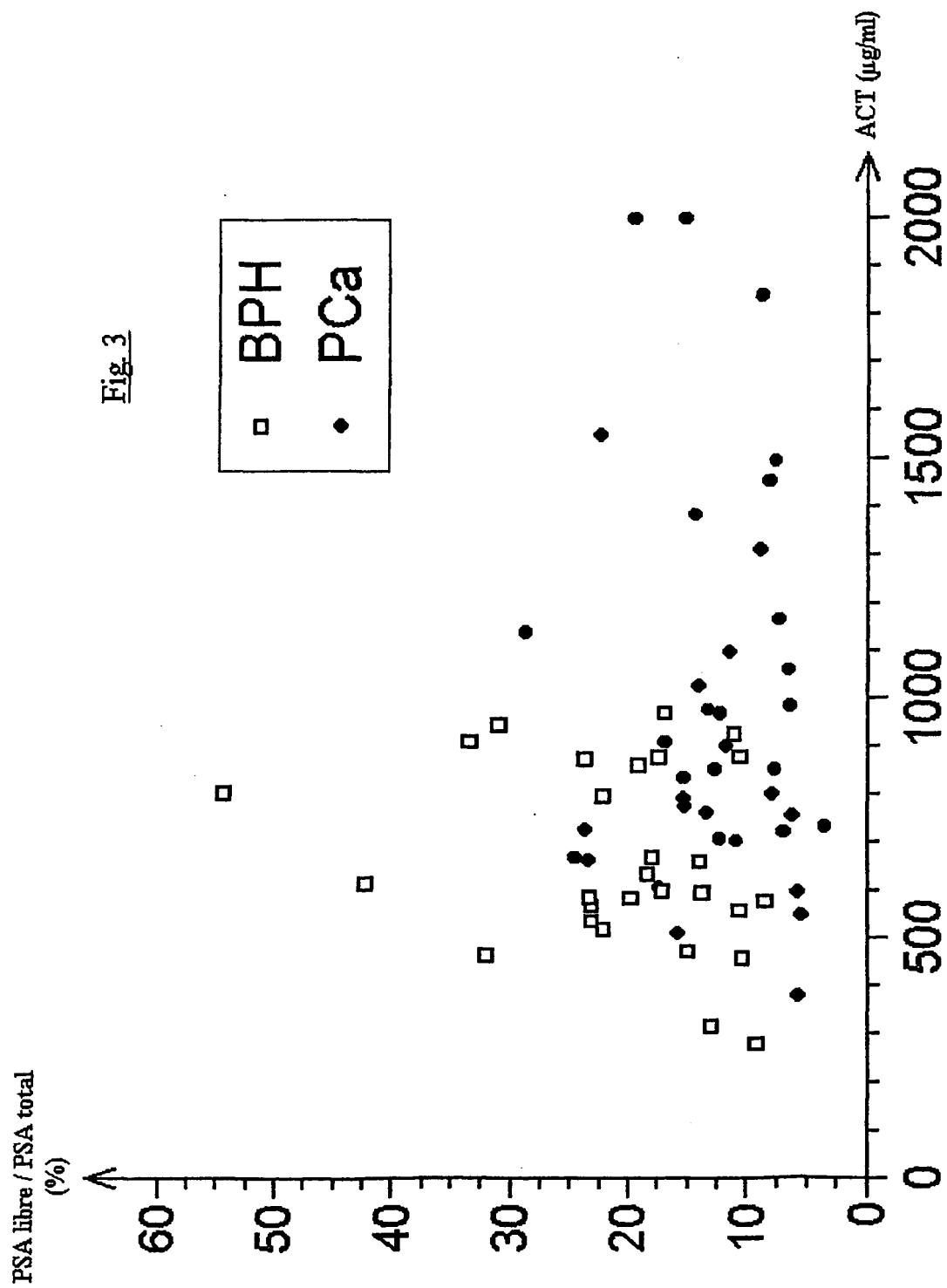
1 / 4



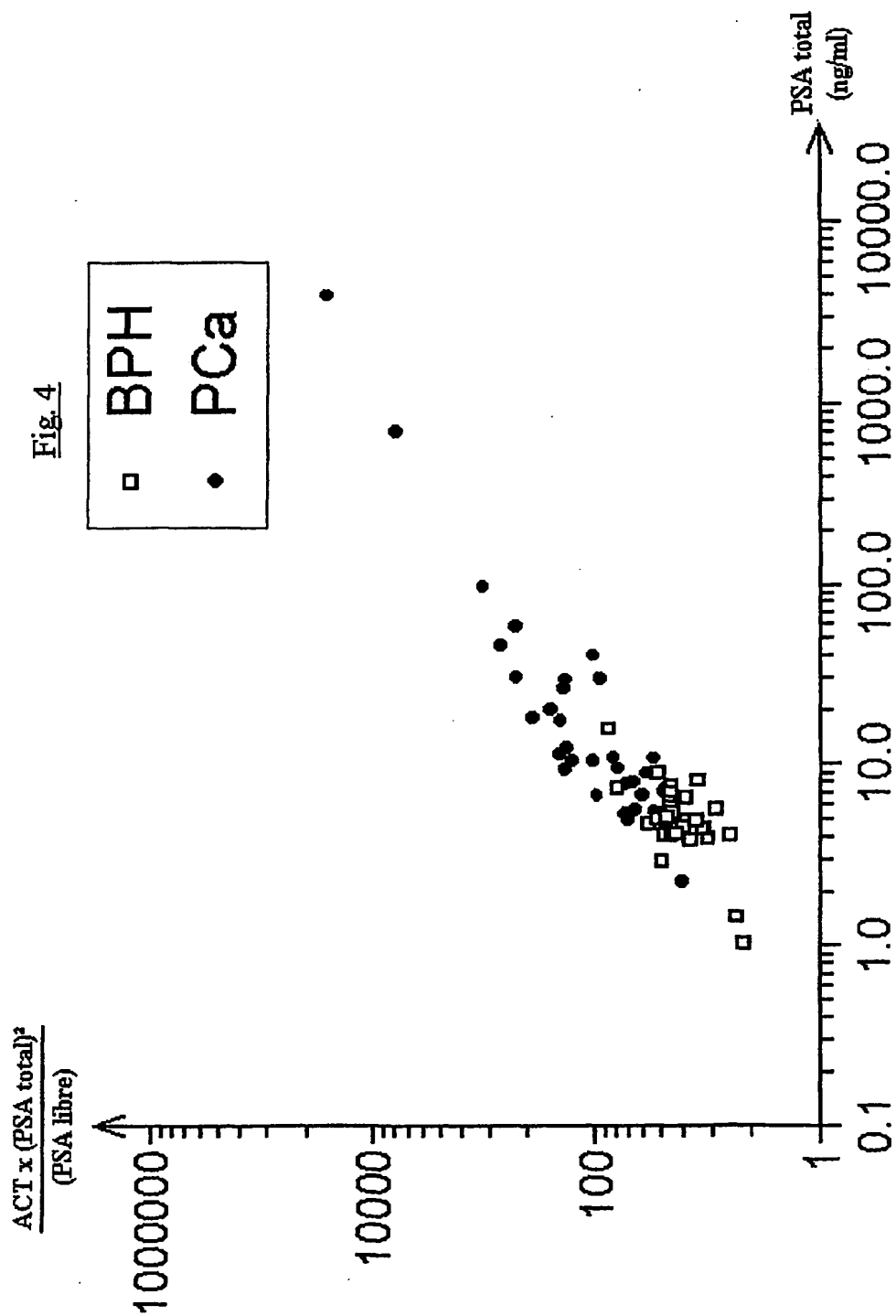
2 / 4



3 / 4



4 / 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01815

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 780 791 A (BIOMERIEUX) 7 January 2000 (2000-01-07) the whole document & WO 00 02052 A 13 January 2000 (2000-01-13) cited in the application	1-15
A	WO 99 61914 A (U.-H. STENMAN) 2 December 1999 (1999-12-02) the whole document	1-15
A	WO 99 10745 A (SCANTIBODIES LABORATORY, INC.) 4 March 1999 (1999-03-04) the whole document	1-15
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

I document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

S document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 October 2001

Date of mailing of the international search report

17/10/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01815

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 92 01936 A (H. LILJA ET AL.) 6 February 1992 (1992-02-06) cited in the application the whole document ---	1-15
A	DE 43 22 342 A (GIF GESELLSCHAFT FÜR IMMUNOLOGISCHE FORSCHUNGSPRODUKTE MBH.) 9 February 1995 (1995-02-09) the whole document ---	1-15
A	WO 95 18381 A (ABBOTT LABORATORIES) 6 July 1995 (1995-07-06) the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/01815

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2780791	A	07-01-2000	FR 2780791 A1	07-01-2000
			AU 4623599 A	24-01-2000
			EP 1095276 A1	02-05-2001
			WO 0002052 A1	13-01-2000
WO 9961914	A	02-12-1999	FI 981185 A	29-11-1999
			EP 1082615 A1	14-03-2001
			WO 9961914 A1	02-12-1999
WO 9910745	A	04-03-1999	US 5994085 A	30-11-1999
			EP 1053475 A1	22-11-2000
			WO 9910745 A1	04-03-1999
WO 9201936	A	06-02-1992	AT 134448 T	15-03-1996
			DE 9117047 U1	18-05-1995
			DE 69117292 D1	28-03-1996
			DE 69117292 T2	18-07-1996
			DE 540573 T1	28-09-1995
			DK 540573 T3	09-04-1996
			EP 0540573 A1	12-05-1993
			ES 2070107 T1	01-06-1995
			WO 9201936 A1	06-02-1992
			GR 3019888 T3	31-08-1996
			JP 2669566 B2	29-10-1997
			JP 6502719 T	24-03-1994
			US 5939533 A	17-08-1999
			US 5912158 A	15-06-1999
			US 5501983 A	26-03-1996
DE 4322342	A	09-02-1995	DE 4322342 A1	09-02-1995
WO 9518381	A	06-07-1995	US 5599677 A	04-02-1997
			AU 1518795 A	17-07-1995
			CA 2178504 A1	06-07-1995
			EP 0741868 A1	13-11-1996
			JP 9508969 T	09-09-1997
			WO 9518381 A1	06-07-1995
			US 5672480 A	30-09-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 01/01815

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/574

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 780 791 A (BIOMERIEUX) 7 janvier 2000 (2000-01-07) le document en entier & WO 00 02052 A 13 janvier 2000 (2000-01-13) cité dans la demande ---	1-15
A	WO 99 61914 A (U.-H. STENMAN) 2 décembre 1999 (1999-12-02) le document en entier ---	1-15
A	WO 99 10745 A (SCANTIBODIES LABORATORY, INC.) 4 mars 1999 (1999-03-04) le document en entier ---	1-15
-/-		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 octobre 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17/10/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Griffith, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 01/01815

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 92 01936 A (H. LILJA ET AL.) 6 février 1992 (1992-02-06) cité dans la demande le document en entier -----	1-15
A	DE 43 22 342 A (GIF GESELLSCHAFT FÜR IMMUNOLOGISCHE FORSCHUNGSPRODUKTE MBH.) 9 février 1995 (1995-02-09) le document en entier -----	1-15
A	WO 95 18381 A (ABBOTT LABORATORIES) 6 juillet 1995 (1995-07-06) le document en entier -----	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 01/01815

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2780791	A	07-01-2000	FR 2780791 A1	07-01-2000
			AU 4623599 A	24-01-2000
			EP 1095276 A1	02-05-2001
			WO 0002052 A1	13-01-2000
WO 9961914	A	02-12-1999	FI 981185 A	29-11-1999
			EP 1082615 A1	14-03-2001
			WO 9961914 A1	02-12-1999
WO 9910745	A	04-03-1999	US 5994085 A	30-11-1999
			EP 1053475 A1	22-11-2000
			WO 9910745 A1	04-03-1999
WO 9201936	A	06-02-1992	AT 134448 T	15-03-1996
			DE 9117047 U1	18-05-1995
			DE 69117292 D1	28-03-1996
			DE 69117292 T2	18-07-1996
			DE 540573 T1	28-09-1995
			DK 540573 T3	09-04-1996
			EP 0540573 A1	12-05-1993
			ES 2070107 T1	01-06-1995
			WO 9201936 A1	06-02-1992
			GR 3019888 T3	31-08-1996
			JP 2669566 B2	29-10-1997
			JP 6502719 T	24-03-1994
			US 5939533 A	17-08-1999
			US 5912158 A	15-06-1999
			US 5501983 A	26-03-1996
DE 4322342	A	09-02-1995	DE 4322342 A1	09-02-1995
WO 9518381	A	06-07-1995	US 5599677 A	04-02-1997
			AU 1518795 A	17-07-1995
			CA 2178504 A1	06-07-1995
			EP 0741868 A1	13-11-1996
			JP 9508969 T	09-09-1997
			WO 9518381 A1	06-07-1995
			US 5672480 A	30-09-1997